

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Paradontologie
der Universität Erlangen - Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. dent. A. Kröncke

**Zur Fähigkeit kariogener
Streptokokken, Glucose über Lactat aerob
vollständig abzubauen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Margit Paulus
aus Roding

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. dent. A. Kröncke

Zur Fähigkeit kariogener Streptokokken, Glucose über Lactat aerob vollständig abzubauen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Margit Paulus
aus Roding

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: Prof. Dr. A. Kröncke

Tag der mündlichen Prüfung: 10.01.1983

I. Einleitung	1
II. Die Geschichte der Dankbarkeit	2
III. Die Bedeutung der Dankbarkeit	3
IV. Die Forderung der Dankbarkeit	4
V. Die Forderung der Dankbarkeit	5
VI. Die Forderung der Dankbarkeit	6
VII. Die Forderung der Dankbarkeit	7
VIII. Die Forderung der Dankbarkeit	8
IX. Die Forderung der Dankbarkeit	9
X. Die Forderung der Dankbarkeit	10
XI. Die Forderung der Dankbarkeit	11
XII. Die Forderung der Dankbarkeit	12
XIII. Die Forderung der Dankbarkeit	13
XIV. Die Forderung der Dankbarkeit	14
XV. Die Forderung der Dankbarkeit	15
XVI. Die Forderung der Dankbarkeit	16
XVII. Die Forderung der Dankbarkeit	17
XVIII. Die Forderung der Dankbarkeit	18
XIX. Die Forderung der Dankbarkeit	19
XX. Die Forderung der Dankbarkeit	20
XXI. Die Forderung der Dankbarkeit	21
XXII. Die Forderung der Dankbarkeit	22
XXIII. Die Forderung der Dankbarkeit	23
XXIV. Die Forderung der Dankbarkeit	24
XXV. Die Forderung der Dankbarkeit	25
XXVI. Die Forderung der Dankbarkeit	26
XXVII. Die Forderung der Dankbarkeit	27
XXVIII. Die Forderung der Dankbarkeit	28
XXIX. Die Forderung der Dankbarkeit	29
XXX. Die Forderung der Dankbarkeit	30
XXXI. Die Forderung der Dankbarkeit	31
XXXII. Die Forderung der Dankbarkeit	32
XXXIII. Die Forderung der Dankbarkeit	33
XXXIV. Die Forderung der Dankbarkeit	34
XXXV. Die Forderung der Dankbarkeit	35
XXXVI. Die Forderung der Dankbarkeit	36
XXXVII. Die Forderung der Dankbarkeit	37
XXXVIII. Die Forderung der Dankbarkeit	38
XXXIX. Die Forderung der Dankbarkeit	39
XL. Die Forderung der Dankbarkeit	40
XLI. Die Forderung der Dankbarkeit	41
XLII. Die Forderung der Dankbarkeit	42
XLIII. Die Forderung der Dankbarkeit	43
XLIV. Die Forderung der Dankbarkeit	44
XLV. Die Forderung der Dankbarkeit	45
XLVI. Die Forderung der Dankbarkeit	46
XLVII. Die Forderung der Dankbarkeit	47
XLVIII. Die Forderung der Dankbarkeit	48
XLIX. Die Forderung der Dankbarkeit	49
L. Die Forderung der Dankbarkeit	50
LI. Die Forderung der Dankbarkeit	51
LII. Die Forderung der Dankbarkeit	52
LIII. Die Forderung der Dankbarkeit	53
LIV. Die Forderung der Dankbarkeit	54
LV. Die Forderung der Dankbarkeit	55
LVI. Die Forderung der Dankbarkeit	56
LVII. Die Forderung der Dankbarkeit	57
LVIII. Die Forderung der Dankbarkeit	58
LIX. Die Forderung der Dankbarkeit	59
LX. Die Forderung der Dankbarkeit	60
LXI. Die Forderung der Dankbarkeit	61
LXII. Die Forderung der Dankbarkeit	62
LXIII. Die Forderung der Dankbarkeit	63
LXIV. Die Forderung der Dankbarkeit	64
LXV. Die Forderung der Dankbarkeit	65
LXVI. Die Forderung der Dankbarkeit	66
LXVII. Die Forderung der Dankbarkeit	67
LXVIII. Die Forderung der Dankbarkeit	68
LXIX. Die Forderung der Dankbarkeit	69
LXX. Die Forderung der Dankbarkeit	70
LXXI. Die Forderung der Dankbarkeit	71
LXXII. Die Forderung der Dankbarkeit	72
LXXIII. Die Forderung der Dankbarkeit	73
LXXIV. Die Forderung der Dankbarkeit	74
LXXV. Die Forderung der Dankbarkeit	75
LXXVI. Die Forderung der Dankbarkeit	76
LXXVII. Die Forderung der Dankbarkeit	77
LXXVIII. Die Forderung der Dankbarkeit	78
LXXIX. Die Forderung der Dankbarkeit	79
LXXX. Die Forderung der Dankbarkeit	80
LXXXI. Die Forderung der Dankbarkeit	81
LXXXII. Die Forderung der Dankbarkeit	82
LXXXIII. Die Forderung der Dankbarkeit	83
LXXXIV. Die Forderung der Dankbarkeit	84
LXXXV. Die Forderung der Dankbarkeit	85
LXXXVI. Die Forderung der Dankbarkeit	86
LXXXVII. Die Forderung der Dankbarkeit	87
LXXXVIII. Die Forderung der Dankbarkeit	88
LXXXIX. Die Forderung der Dankbarkeit	89
LXXXX. Die Forderung der Dankbarkeit	90
LXXXXI. Die Forderung der Dankbarkeit	91
LXXXXII. Die Forderung der Dankbarkeit	92
LXXXXIII. Die Forderung der Dankbarkeit	93
LXXXXIV. Die Forderung der Dankbarkeit	94
LXXXXV. Die Forderung der Dankbarkeit	95
LXXXXVI. Die Forderung der Dankbarkeit	96
LXXXXVII. Die Forderung der Dankbarkeit	97
LXXXXVIII. Die Forderung der Dankbarkeit	98
LXXXXIX. Die Forderung der Dankbarkeit	99
LXXXXX. Die Forderung der Dankbarkeit	100

Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Literaturübersicht	3
3. Eigene Untersuchungen	10
3.1. Material und Methode	10
3.1.1. Bakterien	10
3.1.1.1. Charakterisierung	10
3.1.1.2. Anzucht	11
3.1.2. Experimentelle Durchführung der Abbauversuche	11
3.1.2.1. Vorbereitung der Inkubationsansätze	11
3.1.3. Analytik	13
3.1.3.1. Enzymatische Bestimmung der Glucose-Konzentration	13
3.1.3.2. Enzymatische Bestimmung der Milchsäure-Konzentration	13
3.1.3.3. pH-Messung	13
3.2. Vorversuche	14
3.2.1. Aerober Abbau von Glucose	14
3.2.2. Ersetzen des TSB Nährmediums durch NaCl	15
3.2.3. Wachstum auf Lactat-Agar-Platten	15
3.3. Langzeitversuche	16
4. Ergebnisse	18
5. Diskussion	26
6. Zusammenfassung	35
7. Literaturübersicht	36

1. Einleitung und Problemstellung

Seit vielen Jahren stehen die Plaques im Mittelpunkt der Forschungsbemühungen der Kariologen. Unter dem weißen, fest an der Zahnoberfläche haftenden Belag aus Mikroorganismen, Speichelbestandteilen und Nahrungsresten laufen verschiedene biochemische Prozesse ab, und es entstehen organische Säuren als End- oder Zwischenprodukte der mikrobiellen Fermentation von Kohlenhydraten, die einen wesentlichen Beitrag zum Entstehen und Fortschreiten der Karies leistet (BÜSSMANN 1979).

In den Plaques findet man eine Mischflora verschiedener Bakterienarten, die untereinander auch Wechselbeziehungen eingehen. Eine sehr bedeutende Rolle beim Entstehen der Karies haben die Streptokokken, da sie sehr zahlreich vorkommen, schnell wachsen und als stärkste Säurebildner für die homofermentative Vergärung der Kohlenhydrate zu Milchsäure verantwortlich sind (BURNETT et al. 1968, OSNOE und SANDHAM 1976). Auch sind viele Streptokokken in der Lage, aus den mit der Nahrung aufgenommenen Zuckern intra- und extrazelluläre Polysaccharide (EPS) aufzubauen. Die EPS fördert durch ihre klebrige Konsistenz das Dickenwachstum der Plaque und führen so zu verminderter Abpufferung der gebildeten Säuren durch den Speichel. Durch den Abbau der EPS wird die Säureproduktion über den Zeitraum des Nahrungszuckerangebots hinaus verlängert, wodurch ebenfalls ein weiterer pH-Abfall erreicht wird. Diese Eigenschaften der Plaquestreptokokken unterstreichen ihre Bedeutung für die Kariesgenese (GAWRONSKI 1975).

Bevor man sich eine Vorstellung von den synergistischen und antagonistischen Stoffwechselbeziehungen der Plaquesbakterien untereinander machen kann, ist es notwendig, die Abbauewege und die Fermentationsprodukte der einzelnen Bakterien unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu untersuchen.

Viele Kariologen untersuchten in ihren Arbeiten das Stoffwechselverhalten der grampositiven Streptokokken, da ihnen die bedeutendste Rolle bei der Kariesentstehung zugesprochen wird. DISTLER und KRÖNCKE (1979) zeigten, daß isolierte Kulturen von *Streptococcus mutans* beim anaeroben Abbau von Glucose vor allem Milchsäure und geringe Mengen Ameisen- und Essigsäure bilden. Die entstandene Milchsäure führt zu Demineralisation des Zahnschmelzapatits und damit zu Karies.

Die Autoren HU und SANDHAM (1972) stellten fest, daß bei hohen Konzentrationen ruhender Zellen und Glucoselimination die Streptokokken zuerst Milchsäure produzieren und diese dann selbst weiterverwerten, sobald die angebotene Zuckermenge aufgebraucht ist. Falls viele Streptokokkenstämme in der Lage wären, die von ihnen gebildete Milchsäure in weniger saure Stoffwechselprodukte abzubauen, würden sie nach Meinung der oben genannten Autoren einen wesentlichen Beitrag zur Abnahme der Acidität in der Plaque leisten. Diese Ergebnisse und Überlegungen sprechen gegen Erkenntnisse vieler Kariesforscher, daß die Streptokokken als stärkste Säurebildner für die Kariesentstehung verantwortlich gemacht werden können.

Deshalb soll in dieser Arbeit in Anlehnung an die Studie von HU und SANDHAM (1972) überprüft werden, ob die uns zur Verfügung stehenden kariogenen Streptokokkenstämme die aus Glucose gebildete Milchsäure aerob zu Kohlendioxid, Äthanol und Essigsäure abbauen können.

2. Literaturübersicht

Bereits 1889 spricht MILLER (1892) von einem chemisch-parasitären Prozeß bei der Kariesentstehung und nennt als Hauptverursacher die Milchsäure, die er wegen ihrer sauren Reaktion für die Entkalkung des Schmelzes verantwortlich macht. Es gelang ihm, Mikroorganismen zu isolieren, welche in zuckerhaltigen Lösungen Milchsäure bildeten, und er erkannte schon damals die Vergärung von Kohlenhydraten als Ursache für den Beginn von kariösen Läsionen.

KEYES (KÖNIG 1971) nennt vier ursächliche Faktoren, die gegeben sein müssen, damit Karies entsteht.

1. Wirtsorganismus mit kariesanfälligen Zähnen
2. Mikroorganismen
3. Substrat für Mikroorganismen
4. Zeit.

Wie in der Vipeholm-Studie gezeigt werden konnte (GUSTAFSSON 1954), spielen Kohlenhydrate als Substrat und deren Abbauprodukte eine dominante Rolle bei der kariösen Zerstörung von Zähnen. Dabei ist nicht nur die aufgenommene Zuckermenge entscheidend, sondern eher die Zeitdauer des Säureangriffs auf den Schmelz. Bei vielen Zwischenmahlzeiten oder beim Vorhandensein intrazellulärer Polysaccharide in den Zellen steht den Bakterien dauernd Substrat zur Verfügung, was zu einer kontinuierlichen Milchsäureproduktion führt (GIBBONS 1962). Daraus resultieren über viele Stunden des Tages pH-Werte, die unter dem kritischen Wert von 5 - 5,5 liegen (GRAF 1969).

Die zahlreichste Bakterienart der Mikroorganismen in der Mundhöhle sind die Streptokokken, die unterteilt werden in die Gruppen *Streptococcus salivarius*, *sanguis*, *mitis* und *mutans*. *Streptococcus mutans*, der bei stark zucker-

haltiger Nahrung in der Plaque einen Anteil von 50% ausmacht, scheint der Hauptverursacher von Karies zu sein (BURNETT et al. 1968). Sogar in extremen Situationen fungiert *S. mutans* noch als Säurebildner, wenn leicht zu fermentierende Kohlenhydrate zur Verfügung stehen (CARLSSON 1970). Die Kariogenität der Streptokokken wird noch verstärkt durch ihre Fähigkeit, viele Zuckerarten wie Sucrose, Glucose, Fructose, Galaktose, Maltose, Sorbit und Mannit zu Milchsäure abzubauen (YAMADA et al. 1980) oder daraus intra- oder extrazelluläre Polysaccharide zu synthetisieren (GAWRONSKI 1975, GIBBONS 1962).

Streptococcus mutans steht wegen seiner quantitativen und qualitativen Eigenschaften im Mittelpunkt vieler kariologischer Untersuchungen, aber es bereitet viele Schwierigkeiten, den Stoffwechsel dieser Bakterien in vitro nachzuzüchten. Die natürlichen Gegebenheiten in der Mundhöhle sind nicht definiert, sondern sie variieren von Person zu Person, und auch beim selben Menschen hängen sie von äußeren Einflüssen, dem Gesundheitszustand, der Bakterienanzahl in der Plaque und dem angebotenen Substrat ab. Man versucht deshalb, gleichsam Momentaufnahmen des Streptokokken-Stoffwechsels zu machen und dann mehrere Bilder zu kombinieren. Aber auch dies ist schwierig, da die einzelnen Autoren selten von gleichen Versuchsbedingungen ausgehen und daher aus ganz unterschiedlichen Ergebnissen, die man schlecht vergleichen kann, verschiedene, zum Teil nicht übereinstimmende Schlüsse ziehen.

DISTLER und KRÖNCKE (1979) konnten zeigen, daß isolierte Kulturen von *Streptococcus mutans*-Stämmen beim anaeroben Abbau von Glucose vor allem Milchsäure und geringe Mengen Ameisen- und Essigsäure bilden. Viele andere Untersuchungen ergaben ähnliche Ergebnisse.

In erster Linie finden die Versuche unter anaeroben Bedingungen statt, da eine große Anzahl strikter Anaerobier in den Plaques anaerobe Verhältnisse vermuten lassen. Dies konnte durch Berechnungen von STRALFORS bestätigt werden, nach denen der Sauerstoffpartialdruck in einer Tiefe von etwa 0,32 mm bereits bei 0 angelangt ist (KÖNIG 1971). Aerobe Verhältnisse sind denkbar an der Oberfläche von Belägen oder an den Rändern.

HU und SANDHAM (1972) kamen zu der Überlegung, bei dünnen Plaqueschichten und geringem Zuckerangebot seien für die Streptokokken wesentlich andere Bedingungen gegeben. Dichte Zellmassen, geringe Substratkonzentrationen und aerobe Verhältnisse hielten sie für die gegebene Situation, wie man sie in der Mundhöhle vorfindet.

Sie untersuchten 20 Streptokokken-Stämme auf ihre Fähigkeit, die aus Glucose gebildete Milchsäure aerob abzubauen, indem sie dichte Zellmassen und geringe Glucosemengen inkubierten. Die Ergebnisse zeigen, daß 15 Stämme die Glucose nach spätestens 4 Stunden zu Milchsäure abgebaut hatten und sich dann der Wert der Säure in weiteren 14 Stunden nicht änderte. Vier Stämme der Lancefield Gruppen C, F, G, K waren in der Lage, innerhalb der 18 Stunden auch die Milchsäure abzubauen. Der Stamm *Streptococcus mutans* AHT zeigte ein ganz auffälliges Verhalten. Er konnte die Milchsäure innerhalb von vier Stunden vollkommen verwerten.

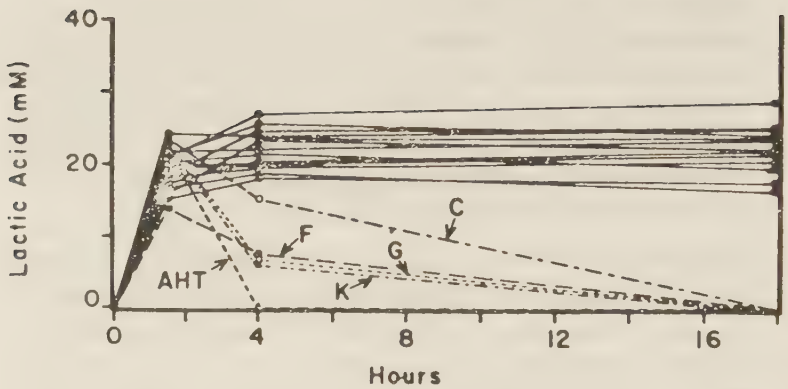


Abb. 1. Änderung der Milchsäurekonzentration bei aerober Incubation von 20 *Strep. mutans*-Stämmen in Glucose (HU und SANDHAM 1972)

Dieser Stamm *Streptococcus mutans* AHT wurde für alle folgenden Untersuchungen verwendet. Bei Zellkonzentrationen von 16,7% und einer Glucosekonzentration von 13,9 mM als geeignetste Versuchsbedingungen wurde die Substratmenge innerhalb von 75 min zu Milchsäure abgebaut, die dann in den folgenden drei Stunden zu Kohlendioxid, Äthanol und Essigsäure fermentiert wurde. Zugleich war ein anfänglicher pH-Abfall zu verzeichnen, der sich mit abnehmender Säuremenge dem Ausgangswert wieder annäherte.

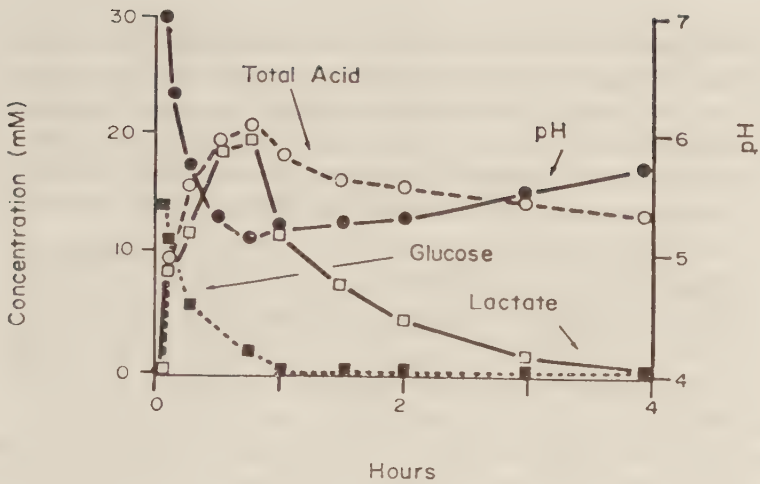


Abb. 2. Änderung des pH-Wertes, der Milchsäurekonzentration und der Glucosekonzentration bei aerober Incubation von *Strep. mutans* AHT in Glucose (HU und SANDHAM 1972)

Die radioaktive Markierung der Glucose ergab als Fermentationsprodukte Essigsäure, Äthanol und Kohlendioxid.

Ein Austausch der Pufferlösung ergab keine Änderung der Versuchsergebnisse. Die anaerobe Inkubation der Bakterien-suspension mit wenig Glucose dagegen ergab bei Verwendung von aktiv wachsenden Zellen eine homofermentative Vergärung mit 97,6% Milchsäure als Endprodukt. Bei Ruhezell-suspensionen war das Hauptprodukt ebenfalls Milchsäure (66%), aber es entstanden auch andere Produkte wie Essigsäure, Buttersäure, Isobuttersäure, Propionsäure, Kohlendioxid und Äthanol. Eine Abnahme der Milchsäuremenge und damit verbundener pH-Wert-Anstieg konnte auch nach 18 Stunden nicht festgestellt werden.

CARLSSON und GRIFFITH (1974), die ebenfalls anaerobe Versuche bei Glucoselimitation durchführten, erhielten bei den Stämmen sanguis und mutans als Fermentations-Hauptprodukte Äthanol, Essigsäure und Ameisensäure neben geringen Mengen Milchsäure, während die Stämme salivarius und bovis die Glucose hauptsächlich zu Milchsäure abbauten, mit wechselnden Anteilen an Äthanol, Ameisensäure und Essigsäure. Auch ELLWOOD et al. (1974) fanden bei ihren Untersuchungen über den Glucoseabbau durch Streptokokken, die aus einer kariösen Läsion isoliert worden waren, eine Abhängigkeit der Fermentationsprodukte von der Verdünnungsrate der Zellsuspensionen. Bei niedrigen Verdünnungsraten, was mit Glucoselimitation gleichzusetzen ist, wurden nur 10% der Glucose zu Milchsäure abgebaut, während bei hoher Verdünnung die ganze verwertete Glucose in Milchsäure umgewandelt wurde:

HU und SANDHAM (1972) zogen aus ihren Untersuchungsergebnissen folgende Schlußfolgerung: Der Stamm Streptococcus mutans AHT kann mit Hilfe von Sauerstoff Lactat zu Kohlendioxid, Äthanol und Essigsäure abbauen und somit einen pH-Wert-Anstieg in der Plaque bewirken. Sie vermuten, daß mehr Streptokokken, als man heute annimmt, zu dieser Stoffwechselleistung fähig sind. Damit verursachen diese Bakterien nicht nur Karies durch ihre Milchsäureproduktion, sondern sie vermindern ihrerseits die Acidität der Plaques. Noch größere Bedeutung für die Kariesgenese hätte diese Entdeckung, falls unter anaeroben Bedingungen andere Elektronen-Acceptoren vorhanden wären.

Die beim anaeroben Glucoseabbau entstandenen Endprodukte werden ihrer Meinung nach nicht über Lactat als Zwischenprodukt gebildet, da die Streptokokken unfähig sind, Milchsäure anaerob abzubauen. Auch CARLSSON und GRIFFITH (1974) vermuten ein Entstehen der Nebenprodukte über Abbau von

Pyruvat. Sie erklären das Produktspektrum bei Glucose-limitation mit der Abhängigkeit des Enzyms Lactat-Dehydrogenase von Zwischenproduktkonzentrationen.

Weniger Arbeiten untersuchten den aeroben Abbauweg der Glucose durch Plaquestreptokokken.

STEGMEIER (1970) erhielt als Hauptprodukt beim Abbau von Glucose im Überschuß 80 - 90% Milchsäure neben wechselnden Mengen Ameisensäure und Essigsäure. Isotopenversuche mit Glucose 1-C-14 und Glucose 6-C-14 bzw. Pyruvat 1-C-14 und Pyruvat 6-C-14 bewiesen einen Abbau nach Embden-Meyerhof bis zur Milchsäure bzw. Brenztraubensäure und eine anschließende oxidative Decarboxylierung dieses Produkts. Der oxidative Pentose-Phosphat-Zyklus und Eutner-Dondoroff-Weg konnten als Abbauege ausgeschlossen werden, und auch der Zitronensäurezyklus ist nicht in größerem Umfang am Abbau beteiligt. Ebenso sprechen die Ergebnisse gegen eine oxidative Heteromilchsäurefermentation und die Fructose-6-phosphat-Phosphoketolasespaltung. Das Nebenprodukt Essigsäure entsteht durch oxidative Decarboxylierung von Lactat bzw. Pyruvat, wobei pro Mol entstandener Essigsäure und Kohlendioxid ein bzw. 1/2 Mol Sauerstoff aufgenommen wird. Die Herkunft der Ameisensäure konnte er nicht eindeutig klären.

YAMADA et al. (1970) fanden bei ähnlichen Versuchen bei Glucose 1-C-14 eine stärkere Abnahme von Sauerstoff und eine 10-fach stärkere Kohlendioxid-Bildung als bei Glucose 6-C-14. Daher vermuten sie eine Beteiligung des Hexosemonophosphat-Weges am Abbau der Glucose.

DALLMEIER (1970) konnte für den anaeroben Hexit-Abbau ebenfalls die Heteromilchsäure-Fermentation und den Pentose-Phosphatweg als Reaktionswege ausschließen. Man kann demnach annehmen, daß ein Glucoseabbau durch Plaquestreptokokken sowohl aerob als auch anaerob erfolgt. Ob die Brenztraubensäure zu Milchsäure oder anderen Säuren fermentiert wird, hängt von den gegebenen Versuchsbedingungen ab.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methode

3.1.1. Bakterien

3.1.1.1. Charakterisierung

In dieser Arbeit wurden acht grampositive, fakultativ anaerobe Streptococcus mutans-Stämme untersucht (Tab.1).

Tabelle 1: Die 8 untersuchten Stämme, ihre Herkunft und ihre serologische Zuordnung

Stamm	Serotyp	Herkunft
634	b	Gehring, Würzburg
441	c	NCTC 10449
249	nicht eingruppierbar	

Stamm	Serobiotyp	Herkunft
C ₂ /21	a	Gehring
T ₃ /52	b	Turku-Sugar
T ₃ /53	c	Studies
OM2 51		Guggenheim, Zürich
OM2 61		Guggenheim, Zürich

3.1.1.2. Anzucht

Die Streptokokken wurden aus den Stichkulturen auf Agar-Platten überimpft und im Brutschrank bei 37°C 24 Stunden gebrütet. In dieser Form konnten die Kulturen im Kühlschrank bei 4°C vier Wochen aufbewahrt werden.

Um für die Versuche größere Bakterienmengen zu erhalten, wurden einzelne Kolonien eines Stammes mit einer sterilen Öse von der Agar-Platte in 50 ml glucosehaltiges Trypticase-Soyton Flüssigmedium (TSB) überimpft und im Brutschrank bei 37°C aerob bebrütet.

Die Nährlösung enthielt folgende Substanzen:

14 g	Bacto Casiton
0,5 g	Bacto Soyton
5 g	Natriumchlorid
2,5 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	Glucose

Die angegebenen Substanzen wurden in einem Erlenmeyer-Kolben in einen Liter aqua bidest aufgelöst und im Autoclaven 15 min bei 121°C sterilisiert.

3.1.2. Experimentelle Durchführung der Abbauversuche

3.1.2.1. Vorbereitung Inkubationsansätze

Die Bakterien wurden nach ca. 18 Stunden gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugieren (20 min bei 4°C) geerntet und anschließend zweimal mit glucosefreiem TSB gewaschen. Die 2% glucosefreie TSB-Lösung enthielt auf 1 Liter aqua bidest.

340 mg	Bacto Casyton
10 mg	Bacto Soyton
100 mg	NaCl
50 mg	KH ₂ PO ₄

Anschließend wurde das Bakteriensediment in 2% glucosefreiem TSB suspendiert und gegen 2% glucosefreie TSB-Lösung photometrisch bei 620 nm auf eine Transmission von 0,1 eingestellt. Aus dieser Suspension wurden jeweils 2,75 ml in einen Erlenmeier-Kolben pipettiert. Unmittelbar vor der Inkubation wurden 0,25 ml Glucoselösung (13,9 mM) hinzugegeben und dann bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert.

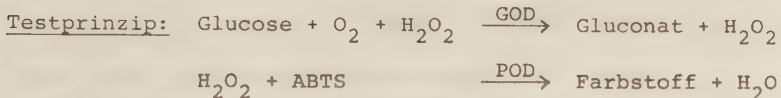
Für einen Versuch wurden jeweils mehrere Proben mit 2,75 ml der gleichen Zellkonzentrationen und mit 0,25 ml der gleichen Glucoselösung versehen. Nach den vorher gewählten Inkubationszeiten wurden die Proben aus dem Wasserbad genommen und die Bakterien sofort bei 4°C 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein steriles Präparateglas mit Kunststoffkappe abgekippt und in Eiswasser gestellt. Anschließend wurde das Sediment zweimal mit 1 ml glucosefreiem TSB gewaschen und der Überstand ebenfalls in das Kappenglas abgegossen. Um sicher zu gehen, daß im Überstand keine Bakterien verblieben waren, die das Ergebnis nachträglich verfälschen konnten, wurde die Flüssigkeit steril mit dem Membranfilter gefiltert und bis zur chemischen Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

Vor und nach der Inkubation wurden die Streptokokken-Stämme mit Hilfe der Gramfärbung nach KOPELOFF lichtmikroskopisch auf Reinheit überprüft.

3.1.3. Analytik

3.1.3.1. Enzymatische Bestimmung der Glucosekonzentration

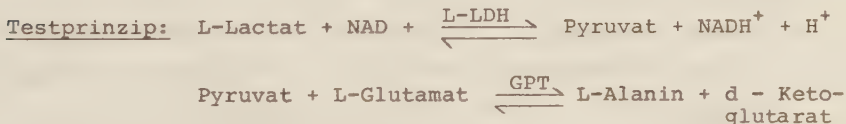
Die Bestimmung der Glucose erfolgte enzymatisch mit der Testkombination der Firma Boehringer, Mannheim.



Die Messung der Proben erfolgte im Spektralphotometer bei 610 nm gegen einen Leerwert. Die Berechnung der Konzentration setzt einen mitgemessenen Standardwert voraus.

3.1.3.2. Enzymatische Bestimmung der Milchsäurekonzentration

Die Milchsäurekonzentration wurde mit dem UV-Test zur Bestimmung von L-Milchsäure in Lebensmitteln der Firma Boehringer, Mannheim, festgestellt.



Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der Milchsäuremenge äquivalent. NADH ist die Meßgröße und aufgrund seiner Absorption bei 334 nm zu bestimmen.

3.1.3.3. pH-Messung

Der pH-Wert der Überstände wurde mit dem Digital-pH-Meter model 701 Orion Research gemessen.

3.2. Vorversuche

In den Vorversuchen sollte ein Stamm gefunden werden, der die Fähigkeit besitzt, das von ihm aus Glucose gebildete Lactat selbst weiter abzubauen.

3.2.1. Aerober Abbau von Glucose

Analog der Versuchsreihe von HU und SANDHAM wurden 2,75 ml Bakteriensuspension und 0,25 ml Glucose im Schüttelwasserbad im Erlenmeyer-Kolben inkubiert, unter folgenden Versuchsbedingungen.

Stamm	T ₃ /53, 634, 441, C ₂ /21
flüssiges Substrat	TSB
geerntet nach ca. 18 h	
zentrifugiert	15 min bei 24°C
	1 x gewaschen mit glucosefreiem 2% TSB
Zellkonzentration	T = 0,15
	suspendiert in 2% glucosefreiem TSB
Glucosekonzentration	15,1 mMol = 3 g auf 1 Liter aqua bidest
Versuch	2,75 ml Zellsuspension + 0,25 ml Glucoselösung im Röhrchen im Schüttelwasserbad
Inkubationszeit	15, 45, 75, 120, 180 min
Überstand untersucht auf	Lactat Glucose

3.1.2. Auswirkung des Ersetzens des TSB-Nährmediums durch NaCl-Lösung

Um auszuschließen, daß die Streptokokken von der verwendeten 2% glucosefreien TSB-Lösung in ihrer Aktivität eingeschränkt worden seien, wurden die folgenden Versuche statt 2% TSB mit physiologischer Kochsalzlösung bei doppelter Zellkonzentration durchgeführt, um den Versuch zu beschleunigen. Versuchsbedingungen wie bei 3.2.1.

Stämme C₂/21; OMZ 51; OMZ 61

Zellkonzentration: T = 0,075

3.2.3. Wachstum der Streptokokken-Stämme auf Lactatplatten

HU und SANDHAM (1972) untersuchten 20 Stämme, von denen 15 auch nach 18 Stunden Inkubationszeit die aus Glucose gebildete Milchsäure nicht verwerten konnten. Vier Stämme benötigten 18 Stunden, während nur der Streptokokken-Stamm AHT die Milchsäure in vier Stunden abzubauen vermochte. Um deshalb generell zu überprüfen, ob einer der zur Verfügung stehenden acht kariogenen Streptokokken-Stämme in der Lage sei, die Milchsäure zu fermentieren, wurden die Bakterien auf Agar-Platten geimpft, die statt Glucose Lactat als Substrat enthielten. Um sicher zu gehen, daß die Bakterien bei ihrem Wachstum wirklich Lactat verwerteten, wurde jeder Stamm je auf eine Agarplatte mit Lactat und zugleich auf eine Agar-Platte ohne Glucose oder Lactat überimpft (nur Casiton, Soyton, NaCl und $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$). Die Platten wurden anschließend im Brutschrank bei 37°C aerob inkubiert und das Wachstum alle 24 Stunden überprüft. Um Verunreinigungen und Ergebnisverfälschungen auszuschließen, wurden die Streptokokken mit Hilfe des Gram-Kopeloff-Verfahrens lichtmikroskopisch auf Reinheit untersucht.

Die Stämme 634 und C₂/21 zeigten schon nach 2 Tagen Wachstum, die Stämme T₃/52, T₃/53, 441, 249, OMZ 51 und OMZ 61 nach 4 Tagen. Auf den Agar-Platten ohne Glucose oder Lactat als Substrat wuchsen die Bakterien genauso schnell wie auf den Agar-Platten mit Lactat.

Diese Methode ließ nicht erkennen, ob ein Streptokokken-Stamm die Milchsäure verwerten kann, da sie sich ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle von den in den Agar-Platten enthaltenen Substanzen vermehren könnten.

3.3. Langzeitversuche

Da bei den Vorversuchen kein Streptokokken-Stamm gefunden werden konnte, der die von HU und SANDHAM (1972) beschriebenen Fähigkeiten analog dem Stamm Streptococcus mutans AHT aufwies, wurde in 18-stündiger Inkubation überprüft, ob einer der uns zur Verfügung stehenden Stämme unter den angegebenen Bedingungen die von ihm gebildete Milchsäure zu Äthanol, Essigsäure und Kohlendioxid fermentiert.

Die Versuchsbedingungen wurden in dieser Untersuchungsreihe für alle Stämme möglichst konstant gehalten, in Anlehnung an die Arbeit der Autoren HU und SANDHAM (1972).

Tabelle 3: Versuchsprotokoll

flüssiges Substrat	TSB
geemtet nach ca.	18 h
zentrifugiert	10 min bei 4°C und 3000 U min ⁻¹ 2 x gewaschen mit je 1 ml glucose- freiem TSB
Zellkonzentration	T = 0,1 suspendiert in 2% glucosefreiem TSB
Glucosekonzentration	15,1 mMol = 0,3 g Glucose / 100 ml aqua bidest
Versuch	2,75 ml Zellkonzentration + 0,25 ml Glucosel. Erlenmeier-Kolben, Schüttelwasserbad 37°C
Inkubationszeit	30 min, 75 min, 2 h, 3, 4, 6, 24 h
Überstand untersucht auf	a) Lactat b) Glucose c) pH-Wert-Messung
Präparat	Gram-Präparate auf Reinheit überprüft.

Untersucht wurden die acht kariogenen Streptococcus mutans-
Stämme C₂/21, 441, 634, 249, T₃/53, T₃/52, OMZ 61, OMZ 51.
(Herkunft und serologische Einordnung siehe 3.1.1.1.).

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse aus den Vorversuchen

In den Vorversuchen wurde geprüft, ob die von uns verwandten Streptokokken Lactat nach der von HU und SANDHAM angegebenen Methode abbauen können.

- Die Stämme T₃/53 und 441 bauten die Glucose in 75 min vollständig ab, analog erreichte die Milchsäurekonzentration ebenfalls nach 75 min den Maximalwert; eine bemerkenswerte Abnahme der Gesamt-Säuremenge konnte nach 3 Stunden nicht festgestellt werden.

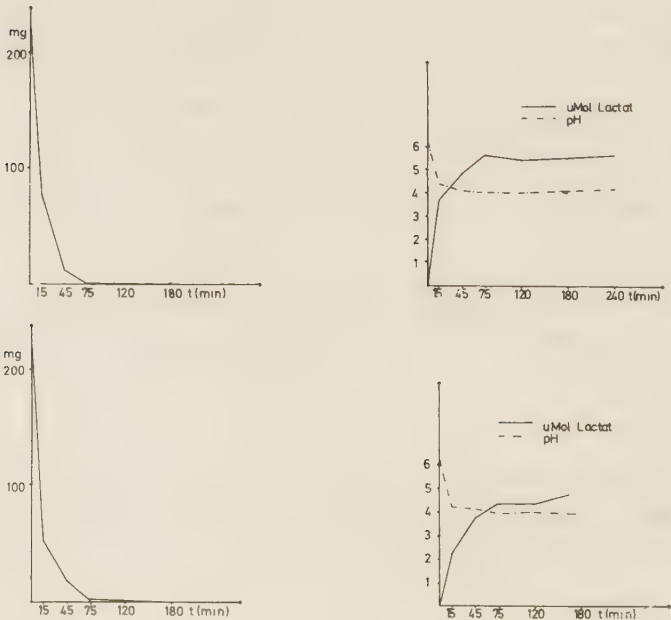


Abb. 3. Änderung der Glucosekonzentration, der Milchsäurekonzentration und des pH-Wertes bei aerober Incubation der Strep. mutans-Stämme 441 (oben) und T₃/53 (unten) in Glucose.

- Der Stamm 634 hatte auch nach 5 Stunden Inkubationszeit die Glucose noch nicht vollständig abgebaut und demnach den maximalen Milchsäurewert nicht erreicht. Es konnte nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, ob diese Bakterien Lactat verwerten können.

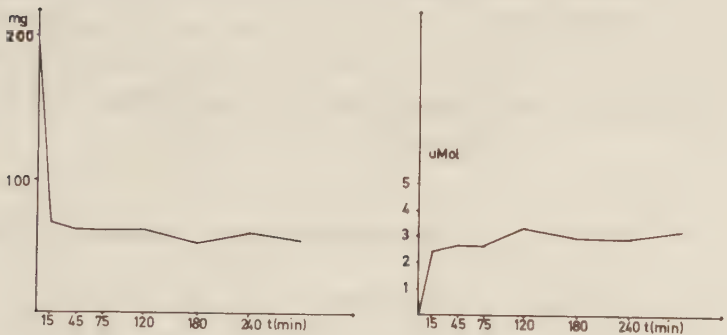


Abb. 4. Änderung der Glucosekonzentration und der Milchsäurekonzentration bei aerober Incubation des Strep. mutans-Stammes 634 in Glucose.

- Der Stamm C₂/21 baute die Glucose in 15 Minuten vollkommen ab, und im Anschluß daran konnte eine geringe Abnahme der Milchsäure-Konzentration und ein Anstieg des pH-Wertes um 0,9 Einheiten verzeichnet werden. Ein zweiter Versuch mit doppelter Zellkonzentration zeigte wieder einen Verbrauch der Glucose nach 15 Minuten. Diesmal war keine Abnahme der Milchsäure-Konzentration bemerkbar, demnach dürfte es sich beim ersten Versuch um geringe Meßabweichungen handeln.

- Die Stämme C₂/21 und OMZ 51 hatten bereits nach 15 Minuten die Glucose abgebaut und die maximale Milchsäure-Konzentration erreicht, die sich auch nach drei Stunden nicht wesentlich verringerte.
- Der Stamm OMZ 61 baute trotz doppelter Zellkonzentration in den vorgegebenen drei Stunden die Glucose nicht vollständig ab.

Tabelle 4: Stoffwechsel der einzelnen Stämme; Versuchsbedingungen siehe 3.2.1. und 3.2.2.

	Stamm	Glucoseabbau		Lactatabbau	pH-Anstieg
		Zeit	Glucose		
	T ₃ /53	75 min	100 %	nein	nein
	441	75 min	100 %	nein	nein
	634	nicht vollständig	80 %	nein	nein
	C ₂ /21	15 min	100 %	nein	nein
doppelte Zellkonz. T=0,075	C ₂ /21	15 min	100 %	nein	nein
	OMZ/51	15 min	100 %	nein	nein
	OMZ/61	nicht vollständig	90 %	nein	nein

Wie aus den Ergebnissen zu sehen ist, kann keiner der untersuchten Stämme die von ihm gebildete Milchsäure in der vorgegebenen kurzen Zeit abbauen. Die von HU und SANDHAM beschriebene Stoffwechselleistung für den Stamm Streptococcus mutans ATH konnten wir in unserer Studie nicht feststellen.

Die zum Abbau der Glucose benötigte Zeit schwankte. Manche Stämme benötigten nur 15 Minuten, während der Stamm 634 auch nach 3 Stunden die Glucose nicht vollständig fermentiert hatte.

Der Ersatz der 2% glucosefreien TSB-Lösung durch Natriumchlorid-Lösung ergab keine Unterschiede.

Eine Verdoppelung der Zellkonzentration führte zu schnellem Glucoseverbrauch durch die Streptokokken. Eine Abnahme der Milchsäure-Konzentration konnte nicht festgestellt werden.

4.2. Ergebnisse der Langzeitversuche

Die 24-stündigen Inkubationen mit den acht vorgegebenen Streptokokken-Stämmen ergaben zusammengefaßt folgende Ergebnisse:

1. Sechs der acht Stämme bauten die Glucose in kurzer Zeit zu Milchsäure ab, die sie nicht weiter fermentierten. Zwei Stämme waren nicht in der Lage, die Glucose in den vorgegebenen 24 Stunden vollkommen zu fermentieren.

Tabelle 5: Zeitdauer des Glucoseumsatzes durch die Streptokokken-Stämme

	Stamm	Glucoseabbau vollständig nach	
A	249	75 Minuten	
	OMZ 51	75 Minuten	
	T ₃ /52	75 Minuten	
	C ₂ /21	30 Minuten	
	441	180 Minuten	
	T ₃ /53	180 Minuten	
B	634	nicht vollständig nach 24 Stunden	80%
	OMZ 61	nicht vollständig nach 24 Stunden	80%

2. Für den Glucoseumsatz in Abhängigkeit von der Zeit ergaben sich demnach zwei typische Verlaufskurven, entsprechend den oben als Gruppen A und B benannten Streptokokken-Stämmen.
3. Die enzymatische Messung der im Überstand befindlichen Milchsäure ergab für die Streptokokken-Stämme der Gruppe A bereits nach 2 Stunden hohe Lactatwerte, die sich auch nach 24 Stunden nicht wesentlich veränderten. Keiner dieser Stämme war demnach in der Lage, Milchsäure für den eigenen Stoffwechsel zu nützen.

Die Stämme 634 und OMZ 61 erreichten den maximalen Lactatwert nicht, da sie auch die Glucose nicht vollständig abbauten. Die Milchsäure-Konzentration blieb konstant.
4. Mit dem maximalen Milchsäurewert hört auch ein Abfall der pH-Werte auf, die sich im Verlauf der 24-stündigen Inkubationszeit nicht mehr veränderten.

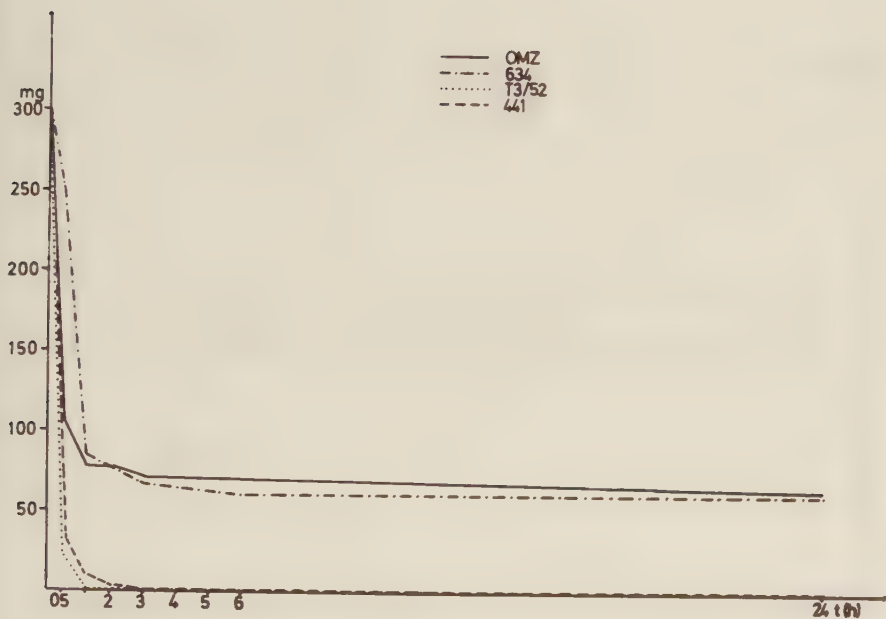


Abb. 5. Änderung der Glucosekonzentrationen während der aeroben Incubation mit *Strep. mutans*-Stämmen und Glucose. Als typische Vertreter wurden die Meßwerte der Stämme OMZ 61, 634, T₃/52 und 441 verwendet.

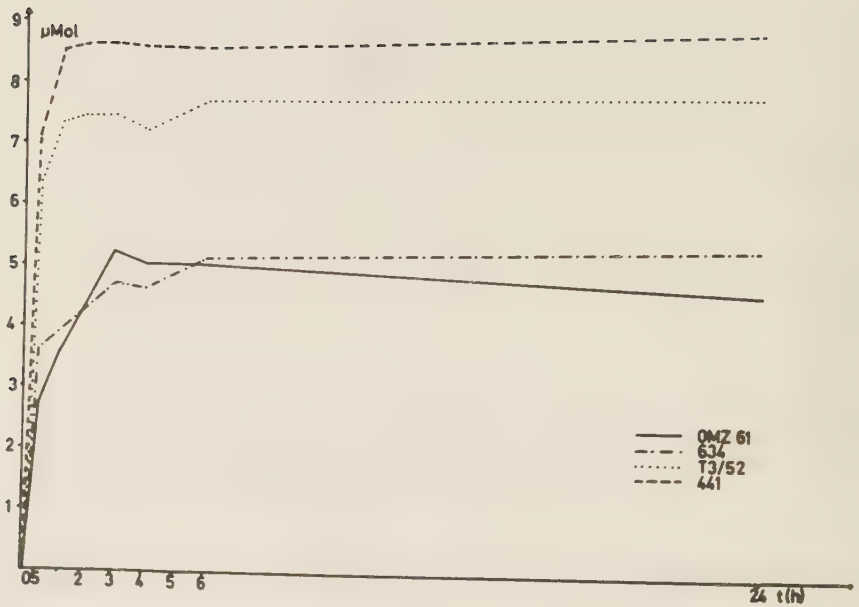


Abb. 6. Änderung der Milchsäurekonzentrationen während der aeroben Incubation mit *Strep. mutans*-Stämmen und Glucose. Als typische Vertreter wurden die Meßwerte der Stämme OMZ 61, 634, T₃/52 und 441 verwendet.

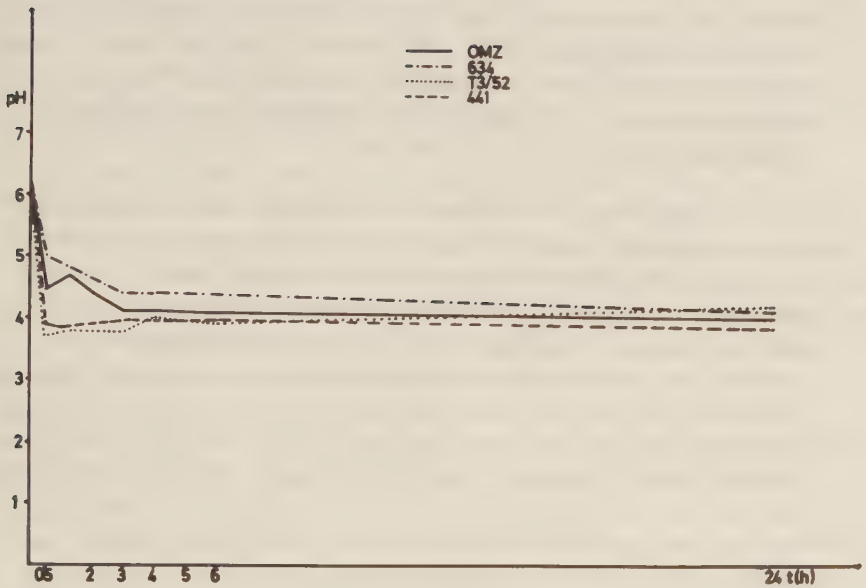


Abb. 7. Änderung der pH-Werte während der aeroben Incubation mit *Strep. mutans*-Stämmen und Glucose. Als typische Vertreter wurden die Meßwerte der Stämme OMZ 61, 634, T₃/52 und 441 verwendet.

5. Diskussion

HU und SANDHAM (1972) vermuten, daß mehr Streptokokken als man heute noch annimmt, die von ihnen aus Glucose gebildete Milchsäure oxidativ abbauen können und damit die Intensität des kariogenen Angriffs der Plaque selbst vermindern. Unsere Untersuchungsergebnisse und die Aussage unserer Stämme können diese Hypothese nicht bestätigen, da keiner der uns zur Verfügung stehenden Streptokokken-Stämme dieses Fermentationsverhalten zeigte.

Wie aus Tabelle 4 zu ersehen ist, erfolgte der Glucoseabbau erwartungsgemäß ziemlich rasch, da einer großen Bakterienzahl nur wenig Substrat zur Verfügung stand. Nach 30 - 180 Minuten war bei sechs von acht Stämmen bereits kein Zucker mehr im Überstand nachweisbar. Die Stämme 634 und OMZ 61 dagegen erreichten keine vollkommene Fermentation der Glucose. Sogar nach 24 Stunden fand man noch ca. 20% der zugegebenen Glucose im Überstand. Bemerkenswert dabei ist ein anfänglich steiler Abfall innerhalb von zwei Stunden auf einen bestimmten Wert der Konzentration, der sich bis zum Versuchsende kaum mehr veränderte. Eine Erklärung für dieses abweichende Verhalten könnte in möglichen Meßfehlern bei der Durchführung des enzymatischen Tests zu finden sein. Dagegen spricht aber die, wenn auch langsame, aber trotzdem kontinuierliche Abnahme des Wertes der Glucose-Konzentration. Außerdem fielen diese beiden Streptokokken-Stämme bereits bei den Vorversuchen durch ihre langsame Substratfermentation auf. Demnach ist der Grund für dieses von den anderen sechs Stämmen abweichende Verhalten eher bei den möglichen Stoffwechseleigenschaften der Bakterien zu suchen.

TISCHER (1978) konnte eine Abhängigkeit der Stoffwechseleigenschaften der Bakterien vom pH-Wert feststellen. Für den Stamm *Streptococcus mutans* 634 fand er ein pH-Optimum bei 7,4. Der Abbau von Glucose und die Milchsäure-Produktion war bis zu einem pH-Wert von 4,5 - 5,0 möglich. Die Wasserstoffionenkonzentration unserer Untersuchung fiel im Verlauf der Inkubation auf einen Wert von 4,1. Damit könnte erklärt werden, wieso Glucose zuerst schnell und dann immer langsamer zu Milchsäure abgebaut wurde. Bei einem pH-Wert von 4,1 könnten möglicherweise die zum Abbau benötigten Enzyme gehemmt sein. Im Vergleich zu diesem Stamm liegen nach TISCHER (1978) die pH-Optima für die Stämme 249, 441 und T₃/53 bei 6,4, und die Glucose-Umsetzung endet bei einem Wert kleiner als 4,0. Der in unserer Studie gefundene durchschnittliche pH-Wert liegt im Bereich von 4,0, für die Stämme 249, 441 und T₃/53 eine noch annehmbare Wasserstoffionenkonzentration, für den Stamm 634 bereits zu sauer.

Die von HU und SANDHAM (1972) untersuchten 20 Streptokokken-Stämme bauten die Glucose wie unsere Stämme der Gruppe A (siehe Tabelle 5) in den ersten 3 - 4 Stunden zu Milchsäure ab. Bei vier Stämmen konnten diese Autoren eine anschließende Fermentation der Säure und damit verbunden einen pH-Anstieg innerhalb von 18 Stunden feststellen. Der Stamm *Streptococcus mutans* AHT fermentierte den Zucker in 75 Minuten zu Milchsäure, die er dann in weiteren 3 Stunden vollkommen zu Kohlendioxid, Äthanol und Essigsäure umsetzte. Diese weniger sauren Endprodukte bewirkten nach dem zuerst notierten pH-Abfall ein Ansteigen fast bis zum Neutralwert.

Bei den von uns untersuchten Streptokokken-Stämmen war dieser oxidative Lactatabbau nicht zu finden. Die nach 3 - 4 Stunden erreichten maximalen Lactatwerte blieben bis zum Ende der Versuchsreihe nach 18 Stunden annähernd konstant. Die geringen Unregelmäßigkeiten und Schwankungen bei den Umsatzkurven dürften auf mögliche Meßfehler beim enzymatischen Test zurückzuführen sein.

Zum Teil fanden wir im Überstand höhere Milchsäuremengen als aus der zu Anfang einpipettierten Glucose entstanden sein konnten. Als mögliche Substratquelle kommen die intrazellulären Polysaccharide in Frage, die von den Streptokokken bei fehlendem Substratangebot wieder zu einfachen Zuckern abgebaut werden können (BÖSSMANN 1979). HU und SANDHAM (1972) folgerten aus ihren Ergebnissen mit dem Stamm *Streptococcus mutans* AHT, daß diese Bakterien ähnlich wie *Streptococcus faecium* Milchsäure oxidieren kann, wenn Sauerstoff als Elektronenacceptor vorhanden ist.

Auch STEGMEIER (1970) untersuchte, ob der Glucoseabbau durch Plaque-Streptokokken unter aeroben Bedingungen zu anderen Ergebnissen führt als unter anaeroben (allerdings bei Substratüberschuß). Als Hauptfermentationsprodukte fand er zu 80 - 90% Milchsäure neben geringen Mengen Ameisen- und Essigsäure, ein Ergebnis, wie wir es schon aus Versuchsreihen unter anaeroben Bedingungen kennen. DISTLER und KRÖNCKE (1979) nannten als Produktspektrum isolierter Streptokokken beim anaeroben Glucoseabbau 81 - 96% Milchsäure, während Ameisen- und Essigsäure nur 4 - 18% der gesamten Säuremenge bildeten.

STEGMEIER (1970) stellte eindeutig einen Abbau der Glucose via EMBDEN-MEYERHOF fest, während YAMADA et al. (1970) vermuten, die Heteromilchsäure-Fermentation sei ebenfalls dabei beteiligt. Diese Autoren fanden nämlich bei Glucose 1-C-14 eine stärkere Aufnahme von Sauerstoff und eine 10-fach höhere Kohlendioxidbildung als bei Glucose 6-C-14. STEGMEIER (1970) dagegen beschreibt keinen Unterschied in der Radioaktivitätsverteilung der Fermentationsprodukte aus Glucose 1-C-14 und Glucose 6-C-14. Bei beiden Substraten betrug die Aktivität des Kohlendioxids ungefähr 0,1%. Demnach schloß er die Heteromilchsäure-Fermentation als möglichen Abbauweg aus, da aus Glucose 1-C-14 aktives Kohlen-

dioxid und inaktive Essigsäure und Milchsäure entstehen müßten. Er wies als Fermentationsprodukte dagegen wechselnde Mengen an inaktiver Ameisensäure und aktiver Essigsäure und 80 - 90% Milchsäure nach, sowohl bei Glucose 1-C-14 als auch bei Glucose 6-C-14. Allerdings stellen auch YAMADA et al. (1970) den EMBDEN-MEYERHOF-Weg an Bedeutung vor den Hexosemonophosphatweg, da die Werte des radioaktiven Lactats kaum Unterschiede zeigten, trotz verschieden markierter Glucose.

DALLMEIER (1970) konnte für den anaeroben Abbau der Hexite ebenfalls die Heteromilchsäure-Fermentation und den Pentosephosphatweg als Reaktionswege ausschließen. Man kann demnach annehmen, daß ein Glucoseabbau durch Streptokokken anaerob als auch aerob via EMBDEN-MEYERHOF bis Pyruvat erfolgt. Bei der Reduktion der Brenztraubensäure durch die Lactatdehydrogenase entsteht Milchsäure, die eine wesentliche Bedeutung bei der Entstehung von Karies hat, da die dissoziierten H-Ionen in den Schmelz diffundieren und Ionen aus dem Kristallgefüge lösen. Der Säurerest der Milchsäure, das Lactat, entfernt in einer Folgereaktion durch Komplexbildung die zur Remineralisation nötigen Kalziumionen. Deshalb ist es entscheidend, wie lange die Säure in Kontakt mit dem Zahnschmelz bleibt (KÖNIG 1971).

HU und SANDHAM (1972) konnten bei Streptococcus mutans AHT nach dem Verbrauch der Glucose ein Abnehmen der Milchsäurekonzentration bis zum Wert 0 und damit verbunden einen pH-Anstieg feststellen. Dieser Stamm kann demnach den Säureangriff auf den Zahn selbst verringern und verliert so an Bedeutung für die Kariesgenese, denn die weniger acide Essigsäure und die neutralen Produkte Äthanol und Kohlendioxid haben kaum Bedeutung für die Demineralisation des Zahnschmelzes. STEGMEIER (1970), der seine Versuche bei Glucose-Überschuß durchführte, konnte neben Milchsäure als Endprodukt nur geringe Mengen Essigsäure und Ameisensäure

finden. Essigsäure entsteht dabei durch oxidative Decarboxylierung, während sich die Herkunft der Ameisensäure nicht eindeutig klären ließ.

Auch wir konnten bei unseren Versuchen keinen Stamm mit bemerkenswerter Abnahme des Wertes der Milchsäure-Konzentration finden und dementsprechend auch keinen pH-Anstieg feststellen.

Bei HU und SANDHAM (1972) zeigte nur 1 Stamm von 20 diese Fähigkeit des oxidativen Lactatabbaus in den vorgegebenen 4 Stunden. Es scheint deshalb fraglich, ob wirklich eine größere Anzahl Streptokokken zu dieser Stoffwechselleistung fähig ist, wie die oben genannten Autoren vermuten. Es könnte umgekehrt auch möglich sein, daß diese qualitative Eigenschaft des Milchsäureabbaus nur dieser eine Stamm *Streptococcus mutans* AHT besitzt. Vielleicht entstand bei der wiederholten Anzucht auf künstlichen Nährboden in den Laboratorien durch Mutation ein Enzym, das bei den gegebenen Verhältnissen Milchsäure zu Essigsäure, Äthanol und Kohlendioxid abbaut. In keiner Arbeit wird ein oxidativer Lactatabbau durch Streptokokken in bemerkenswertem Umfang beschrieben. Nach KÖNIG (1971) besitzen viele Streptokokken kein Zytochromsystem und sind daher überhaupt nicht zu einem oxidativen Abbau befähigt. Sauerstoff ist für sie ein inertes Gas, und sie produzieren daher aus Glucose Milchsäure und andere Säuren.

HU und SANDHAM (1972) konnten diese Eigenschaften des Lactatabbaus nur bei aeroben Bedingungen feststellen. In vivo sind aber nur zu einem geringen Anteil aerobe Verhältnisse denkbar, nämlich in dünnen Plaqueschichten und an den Belagrändern. Bedeutender für die Kariesgenese wäre die Tatsache, wenn statt Sauerstoff auch andere Substanzen als Elektronenacceptoren dienen könnten, da in der Plaque, besonders in den tiefen Schichten, anaerobe Bedingungen vorherrschen. Für *Streptococcus faecalis* zum Beispiel über Fumarat diese Aufgabe (HU und SANDHAM 1972).

In Kontrollversuchen stellten HU und SANDHAM (1972) fest, daß *Streptococcus mutans* AHT anaerob die Milchsäure nicht abbauen kann. Sauerstoff ist demnach essentiell für diesen Vorgang. Als Endprodukte bei anaeroben Bedingungen und Glucose-Limitation erhielten sie 97,6% Milchsäure bei Verwendung von Bakterien, die in der Wachstumsphase geerntet waren. Ruhezellsuspensionen dieser Bakterien führten zu 70% Milchsäure neben Essigsäure, Buttersäure, Isobuttersäure, Propionsäure, Kohlendioxid und Äthanol. Ein Abbau der gebildeten Milchsäure war nicht zu verzeichnen, weshalb die Autoren vermuteten, daß die hier entstandenen Nebenprodukte nicht über Milchsäure als Zwischenprodukt entstanden seien.

Auch CARLSSON und GRIFFITH (1974) untersuchten die Fermentation von *Streptococcus mutans*-Stämmen bei Glucose-Limitation und anaeroben Bedingungen. Als Hauptprodukte bei *Streptococcus sanguis* und *mutans* fanden sie Äthanol, Essigsäure und Ameisensäure neben geringen Mengen Milchsäure, während *Streptococcus salivarius* und *bovis* in erster Linie Glucose zu Lactat verarbeiteten. Sie sahen den Grund für dieses unterschiedliche Verhalten in dem Enzym Lactat-Dehydrogenase, dessen Aktivität - nach Annahme von CARLSSON und GRIFFITH (1974) - von Fructose 1-6-diphosphat geregelt wird. Eine andere mögliche Erklärung sahen sie in der Abhängigkeit des Enzyms von der Pyruvat-Konzentration. Die zwei Stämme, die Glucose zu Äthanol, Essigsäure und Ameisensäure abbauten, haben vielleicht eine Lactat-Dehydrogenase, die hohe Konzentrationen von Fructose 1-6-diphosphat oder Pyruvat erfordert, während die anderen zwei Stämme Enzyme besitzen, die entweder nicht reguliert werden oder nur geringe Konzentrationen der oben genannten Zwischenprodukte für ihre Aktivität benötigen.

Auch HUIS in't VELT und BAKER (1978) untersuchten den anaeroben Glucose-Stoffwechsel der Streptokokken und fanden bei portionierten Zuckerzugaben gemischte Fermentationsprodukte und erklärten dies mit der Abhängigkeit des Enzyms Lactat-Dehydrogenase von der Menge des Zwischenprodukts Fructose-1-6-diphosphat. Bei wenig Substrat tritt das Enzym Pyruvat-Gomate-Lyase in Aktion und baut Pyruvat zu Äthanol, Ameisen- und Essigsäure ab.

Auch MIKX und VAN DER HOEVEN (1975) und ELLWOOD et al. (1974) bestätigten diese Abhängigkeit des Produktspektrums von der angebotenen Substratmenge. Sie untersuchten den Glucoseabbau bei verschiedenen Verdünnungsraten der Zellsuspensionen und fanden bei geringen Bakterienkonzentrationen eine homofermentative Vergärung des Zuckers zu Milchsäure. Bei niedrigen Verdünnungsraten dagegen war Essigsäure das Hauptprodukt neben Ameisensäure und Milchsäure, was einer Limitation der Glucose gleichkommt.

CARLSSON und GRIFFITH (1974), HUIS in't VELT und BAKER (1978), ELLWOOD et al. (1974) und MIKX und VAN DER HOEVEN (1975) fanden für die Bedingungen der Glucose-Limitation ein gemischtes Produktionsspektrum mit verringerten Mengen Milchsäure. Allerdings entstanden die Nebenprodukte durch Abbau von Pyruvat und nicht durch Oxidation des Lactats.

Die von uns untersuchte Glucose-Limitation entspricht im Mund den Bedingungen, wie man sie in den nahrungsaufnahmefreien Intervallen vorfindet. Der Hauptsäureangriff auf den Zahn erfolgt aber nach den Mahlzeiten, wie ein markanter pH-Abfall zeigt. Die Wasserstoff-Ionenkonzentration steht in enger Beziehung zum entkalkenden Säureangriff auf den Schmelz und ist ein Maß für die in der Plaque gebildete Säure und hängt stark von der Menge und Qualität der Kohlenhydratzufuhr ab (GRAF 1969). Der kritische pH-Wert, bei

dem Apatit in die Lösung geht, ist bei 5,0 - 5,5 erreicht (BÖSSMANN 1979).

GRAF (1969) konnte zeigen, daß eine saure Reaktion der Plaque wesentlich von ihrer Dichte abhängt und daß zwischen Substrat-Konzentrationen, Puffer-Kapazität der Mundhöhlen-Flüssigkeit und Menge der gebildeten Säuren ein quantitativer Zusammenhang besteht. Der pH-Abfall allein ist kein Maß für die Kariogenität des Nahrungsmittels oder Bakteriums, sondern ein entscheidender Faktor ist auch die Dicke der Plaque. Die Puffer-Substanzen des Speichels können bei dünnen Belägen durch die ganze Dicke in genügender Menge diffundieren und alle Säuren neutralisieren. Diese Tatsache vermindert die Bedeutung des Lactat-Abbaus der Streptokokken bei aeroben Bedingungen, da bei den dafür notwendigen dünnen Plaques die Gefahr des Säureangriffs schon durch den Speichel gemindert wird.

Falls die Streptokokken bei anaeroben Bedingungen tatsächlich ein Substrat als Elektronenacceptor zur Verfügung hätten und zum oxidativen Lactat-Abbau fähig wären, würde dies bei Glucose-Limitation ebenfalls keine dominante Rolle spielen für eine verminderte Intensität des kariogenen Angriffs. Viele Arbeiten ergaben nämlich für die Situation in tieferen Plaqueschichten eine Nahrungskette für Streptokokken und den strikt anaeroben Veillonellen. Wie DISTLER und KRÖNCKE (1979) berichten, fällt beim Zuckerabbau durch Plaque der Anteil von Milchsäure im Produktspektrum in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Bereits nach einstündiger Inkubation erreicht Milchsäure nur noch einen Anteil von 51,8%, Essigsäure 20,5%, Propionsäure 19,4% und Ameisensäure 12,8%. Erklärt wird dieses Ergebnis durch das Vorhandensein von Veillonellen in Plaque, die die Milchsäure zu Propionsäure und Essigsäure abbauen können. Während die Streptokokken bei Zucker-Limitation ihr Substrat fermentieren, wird das dabei entstehende Lactat schon von den Veillonellen weiterverwertet. Das bedeutet, die Streptokokken hätten gar nicht mehr die Möglichkeit, die von ihnen gebildete Milchsäure selbst zu nutzen.

Nach ONOSE und SANDHAM (1976) ist die Hauptstoffwechselleistung von *Streptococcus mutans* die Säureproduktion, wodurch die Intensität des kariogenen Angriffs der Plaque auf den Zahn bestimmt wird. Die Bedeutung eines möglichen oxidativen Lactat-Abbaus bei Glucose-Limitation und aeroben Verhältnissen für eine Abnahme von Karies scheint zweifelhaft, denn keiner der von uns untersuchten Stämme zeigte die oben genannte Eigenschaft und auch andere Autoren beschrieben dies nicht. Außerdem werden als entscheidende Faktoren für einen starken Säureangriff auf den Schmelz und damit verbundener Demineralisation genannt:

1. dicke Plaqueschichten mit kariogenen Streptokokken,
2. ausreichendes Glucose-Angebot.

Die von uns untersuchten Bedingungen des Glucose-Abbaus bei wenig Substratangebot und bedingt durch aerobe Verhältnisse dünner Plaqueschichten würden in vivo keinen starken Säureangriff auf den Schmelz bedeuten. Die geringen Mengen Milchsäure, die dabei entstehen, können durch die Pufferkapazität des Speichels neutralisiert werden.

6. Zusammenfassung

In Anlehnung an die Studie von HU und SANDHAM (1972) untersuchten wir acht kariogene Streptokokken-Stämme, ob sie die aus Glucose gebildete Milchsäure aerob abbauen können.

Dabei fanden wir folgende Ergebnisse:

1. Glucose wird von allen acht untersuchten Stämmen abgebaut.
2. Die Umsatzgeschwindigkeit ist unterschiedlich; bei sechs Stämmen ist nach 3 Stunden ein vollständiger Abbau erreicht, zwei Stämme haben auch nach 24 Stunden erst 80% Glucose umgesetzt.
3. Bei allen Stämmen ist Milchsäure das Hauptprodukt. Die gefundene Menge entspricht den molaren Verhältnissen.
4. Parallel zur Bildung der Milchsäure wird ein pH-Abfall beobachtet, der erniedrigte pH-Wert bleibt bis zum Versuchsende konstant.
5. Ein Abbau von Lactat konnte in keinem Fall beobachtet werden.

7. Literaturübersicht

1. BÖSSMANN, K.: Bildung, Zusammensetzung und Stoffwechsel der Plaque und ihre ätiologische Bedeutung für die Entstehung von Karies.
Kariesprophylaxe 1, 3-14 (1979)
2. BURNETT, G.W., SCHERP, H.W.: Oral microbiology and infections disease.
Williams Wilkins, Baltimore 1968
3. CARLSSON, J.: Nutritional Requirements of Streptococcus mutans.
Caries Res. 4, 305-320 (1970)
4. CARLSSON, J., GRIFFITH, C.J.: Fermentation products and bacterial yields in glucose-limited and nitrogen limited cultures of streptococci.
Archs. oral Biol. 19, 1105-1109 (1974)
5. DALLMEIER, E., BESTMANN, H.-J., KRÖNCKE, A.: Über den Abbau von Glucose und Sorbit durch Plaque-Streptokokken.
Dtsch. zahnärztl. Z. 25, 887-898 (1970)
6. DISTLER, W., KRÖNCKE, A.: Der Stoffwechsel isolierter Streptokokken und Plaque im Vergleich.
Dtsch. zahnärztl. Z. 34, 162-164 (1979)
7. ELLWOOD, D.C., HUNTER, J.R., LONGYEAR, V.M.: Growth of streptococcus mutans in a chemostat.
Arch. oral Biol. 19, 659-664 (1974)

8. GAWRONSKI, T.H., STAAT, R.A., ZAKI, H.A., HARRIS, R.S.,
FOLKE, L.A.E.: Effects of dietary sucrose
levels on extracellular polysaccharide metabolism
of human dental plaque.
J. dent. Res. 54, 881-890 (1975)
9. GIBBONS, R.J., SOCRANSKY, S.S.: Intracellular poly-
saccharide storage by organisms in dental
plaques.
Arch. oral Biol. 7, 73-80 (1962)
10. GRAF, H.: Telemetrie des pH der Interdentalplaque.
Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 79, 146-178 (1969)
11. GUSTAFSSON, B.E., QUENSET, C.E., LANKE, L.S., LINDQUIST,
C., GRAHNEN, H., BONOW, B.E., KASSE, B.: The
Vipeholm dental caries study.
Acta odont. scand. 11, 232-388 (1954)
12. HU, G., SANDHAM, H.J.: Streptococcal utilization of
lactic acid and its effect on pH.
Arch. oral Biol. 17, 729-743 (1972)
13. HUIS in't VELT, J.H.J., BAKER, D.O.: Intracellular
polysaccharide metabolism in streptococcus
mutans.
Caries Res. 12, 243-249 (1978)
14. KÖNIG, K.G.: Karies und Kariesprophylaxe.
Wilhelm Goldmann Verlag, München (1971)
15. MIKX, F.H.M., HOEVEN van der J.S.: Symbiosis of strepto-
coccus mutans and Veillonella alcalescens in
mixed continous cultures.
Arch. oral Biol. 20, 407-410 (1975)
16. MILLER, W.D.: Die Mikroorganismen der Mundhöhle.
Georg Thieme Verlag, Leipzig (1892)

17. ONOSE, H., SANDHAM, H.J.: pH-changes during culture of human dental plaque streptococci on mitis salivarius agar.
Arch. oral Biol. 21, 291-296 (1976)
18. STEGMEIER, K.H.: Untersuchungen über den aeroben Glucose-Abbau durch Plaquestreptokokken.
Diplomarbeit, Erlangen 1970
19. TISCHER, K.: Zur pH-Abhängigkeit des Glucoseabbaus und der Milchsäurebildung isolierter Plaque-Streptokokken.
Med. Diss., Erlangen (1979)
20. YAMADA, T., HOJO, S., KOBAYASHI, K., ASANO, Y., ARAYA, S.: Studies on the carbohydrate metabolism of cariogenic streptococci mutans strain pk-1.
Arch. oral Biol. 15, 1205-1217 (1970)
21. YAMADA, T., KIMURA, S., IGARASKI, K.: Metabolism of Glucosylsucrose and Maltosylsucrose by Streptococcus mutans.
Caries Res. 14, 239-247 (1980)

Herrn Professor Kröncke danke ich für die Überlassung des Themas und dafür, daß er es mir ermöglichte, die Versuche im biochemischen Labor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Paradontologie durchzuführen.

Außerdem möchte ich mich bedanken bei Herrn Dr. Distler, Frau Degeorgio und Frau Zitterbart für die freundliche Unterstützung bei meiner experimentellen Arbeit.

Lebenslauf

Geboren am 09.03.57	in Roding als 2. Kind des Landwirts Lorenz Paulus und seiner Ehefrau Johanna, geb. Pusl.
Ab September 1963	Besuch der Volksschule in Roding, Landkreis Cham.
September 1967	Übertritt in das Humanistische Gymnasium in Cham.
Juni 1976	Abitur.
Oktober 1976	Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover.
November 1977	Wechsel an die Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen.
Juli bis Dezember 1981	Zahnärztliche Prüfung.

Copy - Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197